

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИЗУЧЕНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ ГАЛАНИНА И ЕГО N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Д.В. Авдеев^{1*}, О.Ю. Селютина², М.В. Сидорова¹, О.И. Писаренко¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова, 121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15а; * эл. почта: mityaavdeev93@mail.ru

²Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, ул. Институтская, 3

Экзогенные N-концевые фрагменты галанина, являющиеся агонистами рецептора GalR2, обладают терапевтическим потенциалом при экспериментальной патологии сердца, что предполагает необходимость изучения их протеолитической устойчивости в биологических средах. Цель настоящей работы состояла в оценке протеолитической деградации галанина G1 (GWTLSAGYLLGPH AIDNHRFSFSDKHGLT-NH₂), его природного и модифицированного фрагментов G2 и G3 (WTLNSAGYLLGPHA-OH и WTLNSAGYLLGPβAH-OH, соотв.) в плазме крови человека. Пептиды были получены твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии, очищены с помощью ВЭЖХ, их структура подтверждена методами MALDI-TOF масс-спектрометрии и ¹H-ЯМР спектроскопии. Кинетику деградации галанинов G1–G3 в плазме крови изучали методом ¹H-ЯМР спектроскопии по изменению интенсивности сигналов от Trp2 при температуре 310 К. Результаты свидетельствуют о большей протеолитической стабильности пептида G3 по сравнению с природным фрагментом G2 и полноразмерным галанином G1. Они указывают на перспективность использования модифицированных пептидных агонистов рецепторов GalR2 для защиты жизненно важных органов при патофизиологических состояниях.

Ключевые слова: галанин; N-концевые фрагменты галанина; ¹H ЯМР; плазма человека

DOI: 10.18097/PBMCR1540

ВВЕДЕНИЕ

Нейропептид галанин (G1) широко распространён в центральной и периферической нервной системе, а также в других тканях [1]. В периферических органах, включая сердце, G1 действует не только через нейрональные механизмы, но и активируя представителей семейства трансмембранных рецепторов GalR1-3 [2]. G1 участвует в жизненно важных процессах — запоминания, потребления пищи, засыпания, продукции ряда гормонов; на клеточном уровне — в поддержании ионного гомеостаза и осмоса [1]. Роль рецепторов G1 в регуляции сердечно-сосудистой системы при различной патологии малоизучена. Недавно мы показали, что внутривенное введение G1 (GWTLSAGYLLGPH AIDNHRFSFSDKHGLT-NH₂) крысам после региональной ишемии миокарда снижает некротическое повреждение кардиомиоцитов [3]. Этот эффект опосредован активацией рецепторов GalR2 и значительно снижается под влиянием антагониста GalR2 M871 [4]. N-концевой фрагмент галанина (аминокислотные остатки 2–15), WTLNSAGYLLGPHA-OH (G2), обладающий высоким сродством к GalR2 подтипу рецепторов, повышает жизнеспособность клеток, ингибирует апоптоз и образование супероксида и пероксида водорода в митохондриях кардиомиоцитов крыс линии H9C2 при гипоксии/реоксигенации [5]. Химически модифицированный аналог G2 — химерный агонист

рецепторов GalR2 WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G3) уменьшает размер инфаркта и активность маркёров некроза в плазме крови крыс при реперфузии [4], а также снижает дисфункцию левого желудочка и улучшает энергетическое состояние и функцию митохондрий в сердце крыс с доксорубициновой кардиомиопатией [6]. Изучение экспрессии рецепторов галанина в сердце показало, что GalR2 является доминирующим подтипом рецепторов галанина в миокарде, кардиомиоцитах и кардиомиообластах H9C2 [7]. Генетическое подавление GalR2 способствует гипертрофии сердца, фиброзу и избыточной генерации активных форм кислорода (АФК) в митохондриях сердца [8]. Эти результаты продемонстрировали возможность коррекции метаболизма и функции сердца с помощью галанина и его высокоаффинных по отношению к рецепторам GalR2 агонистов G2 и G3 в условиях энергетического дефицита и окислительного стресса. Фармакологическое использование этих лигандов предполагает необходимость изучения периодов их полураспада и кинетики деградации в плазме, поскольку имеющиеся об этом сведения в литературе крайне ограничены. Известно, что время полураспада G1 (1–29) *in vivo* составляет не более 5 мин [9, 10], а информация о протеолитической стабильности пептидов G2 и G3 отсутствует. В связи с этим целью настоящей работы было изучение протеолитической деградации пептидов G1–G3 в плазме крови человека методом ¹H-ЯМР спектроскопии. В данной работе мы сообщаем



об идентификации некоторых продуктов деградации полноразмерного галанина G1, его природного и модифицированного фрагментов G2 и G3 и оценке их стабильности в модельной системе *in vitro*.

МЕТОДИКА

Реагенты

Производные Fmoc-защищенных аминокислот были приобретены у “Novabiochem” (Швейцария) и “Bachem” (Швейцария). Реагенты для синтеза пептидов были закуплены у компании “Fluka Chemie GmbH” (Швейцария). Растворы готовили с использованием деионизированной воды (“Millipore Corporation”, США). Для приготовления образцов в ЯМР экспериментах использовали дейтерированную воду (“SOLVEX”, Россия, 99,8% D).

Синтез пептидов галанина

Полноразмерный галанин крысы G1 получен конвергентным твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии на амидном полимере Ринка [11]. Пептидную цепь в ходе синтеза наращивали по одной аминокислоте и фрагментной конденсацией. Фрагменты с С-концевым остатком глицина получали твердофазным методом на 2-хлортритилхлоридной смоле или в растворе. Фрагментную конденсацию проводили на полимерном носителе с использованием комплекса F — аддукта N,N'-дициклогексилкарбодиимида и пентафторфенола в мольном отношении 1:3 [11]. Пептид G2 представляет собой N-концевой фрагмент последовательности галанина. Пептид G3 — химерная молекула, в которой С-концевая часть фрагмента галанина (2–13), содержащего фармакофорные аминокислотные остатки Trp2, Asn5, Gly8 и Tyr9 [12], необходимые для связывания с клеточными рецепторами GalR2, дополнена последовательностью дипептида карнозина — βAla-His-ОН. Карнозин хорошо растворим в водных средах и известен как антиоксидант прямого действия; он содержит β-аминокислоту, наличие которой в пептидах увеличивает их протеолитическую стабильность [13]. Автоматический синтез пептидов G2 и G3 [14] проводили на синтезаторе Tribute-UV (“Protein Technologies Inc.”, США) в масштабе 0,15 ммоль в соответствии с программой однократной конденсации Fmoc-аминокислот (“Novabiochem”) с использованием полимерного носителя с 2-хлортритилхлоридной якорной группой

(“Iris Biotech”, Германия), содержащего 1,2 экв. Cl/H. Для создания амидной связи применяли N,N,N',N'-тетраметил-О-(бензотриазол-1-ил)уриония гексафторфосфат (HBTU) в присутствии двукратного мольного избытка N-метилморфолина. По окончании синтеза пептиды G1–G3 отщепляли от полимера с одновременным удалением защитных групп при помощи смеси TFA–вода–триизопропилсилан–дитиотреитол (85 : 5 : 5 : 5). Продукты твердофазного синтеза очищали высокоэффективной жидкостной хроматографией на обращённой фазе (ВЭЖХ) до чистоты 97–98% на хроматографе Knauer с колонкой (250×20 мм) Eurospher 100-10 C18 (“Knauer”, Германия). В качестве элюентов использовали буфер А — 0,1% водный раствор TFA, буфер Б — 80% ацетонитрил (“Carl Roth GmbH”, Германия) в буфере А. Элюцию проводили от 100% буфера А линейным градиентом концентрации буфера Б 0,5 %/мин при скорости потока 3 мл/мин; детекцию осуществляли при 220 нм. Аналитическую ВЭЖХ проводили на приборе Smartline (“Knauer”). Условия ВЭЖХ: колонка Kromasil 100-5 C18 (“AkzoNobel”, Швеция) (4,6×250 мм), буфер А — 0,1% водный раствор TFA, буфер Б — 80% ацетонитрил в буфере А, элюция со скоростью 1 мл/мин градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20% до 80% за 30 мин, детекция при 220 нм. Структуру пептидов подтверждали с использованием времяпролётной масс-спектрометрии (MS) с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF). Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Bruker Autoflex speed (“Bruker Daltonics Inc.”, Германия). Структура пептидов G1–G3 подтверждена также с помощью ¹H-ЯМР спектроскопии (спектрометр WH-500 Bruker 500 МГц, Германия). Аминокислотные последовательности и характеристики пептидов представлены в таблице 1.

Получение плазмы человека

Плазму получали из крови одного здорового донора путём венепункции и осаждения клеточных элементов с использованием вакуумной пробирки, содержащей этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в качестве антикоагулянта, с последующим центрифугированием [15].

Измерение концентраций пептидов галанина в плазме

Для исследования кинетики деградации галанинов в плазме крови 450 мкл плазмы помещали в стандартную 5 мм ампулу для ЯМР. В образец

Таблица 1. Характеристики пептидов галанина

	Последовательность	Мол. масса	MS (m/z)	ВЭЖХ		Растворимость в воде (мг/мл)
				R _t (мин)	Чистота (%)	
G1	GWTLNSAGYLLGPH AIDNHR SFSDKHGLT-NH ₂	3164,45	3163,47 [M] ⁺	15,80	98,1	>40
G2	WTLNSAGYLLGPH A-ОН	1499,67	1498,64 [M] ⁺	15,34	97,1	≈10
G3	WTLNSAGYLLGPBAH-ОН	1499,67	1499,76 [M] ⁺	14,66	98,2	>20
			1521,73 [M+Na] ⁺			
			1537,72 [M+K] ⁺			

Примечание: R_t — время удерживания.

добавляли 50 мкл D₂O для фиксации резонанса дейтерия для достижения стабилизации частоты поля. Запись спектров производили с подавлением сигнала воды при помощи градиентного возбуждения (импульсная последовательность p3919gp). Для выделения сигналов, принадлежащих протонам пептида, применяли разностную спектроскопию: из каждого спектра, полученного после добавления пептида в плазму крови, вычитали спектр плазмы без пептида. Эксперименты проводили при температуре 310 К. Полное время инкубации составляло 140 мин. Отнесение сигналов производилось с помощью метода двойного резонанса. Спектры ¹H-ЯМР были записаны на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц (Германия). Концентрация пептидов галанина в инкубационной среде составляла 2,5 мМ. Все эксперименты повторялись трижды, константы скорости реакции приведены как среднее значение ± среднеквадратичное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки стабильности пептидов галанина в плазме человека был применён метод ¹H-ЯМР-спектроскопии, позволяющий мониторировать деградацию пептидов без выделения продуктов распада из инкубационной среды. Ранее мы использовали его для сравнительной оценки протеолитической стабильности пептидных ингибиторов киназы лёгких цепей миозина [15], апелина-12 и его модифицированного аналога [16]. На рисунке 1 приведены фрагменты ¹H-ЯМР спектров, полученные при деградации пептида G2 в плазме крови. По мере протекания реакции отмечено уменьшение интегральной интенсивности сигналов от а.о. Trp2, входящего в состав пептида. Также наблюдается падение интенсивности сигналов при 8,01 ppm и 7,1 ppm, соответствующих

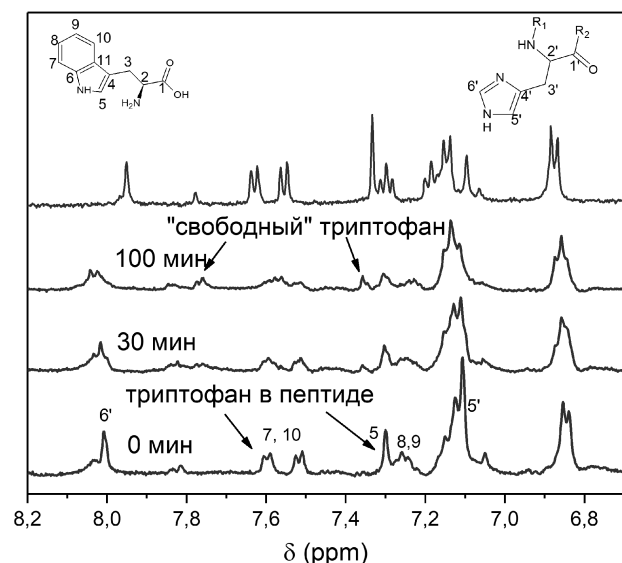


Рисунок 1. Фрагменты ¹H-ЯМР спектров пептида G2 сверху вниз последовательно: в фосфатно-солевом буфере, в плазме крови человека через 100 мин инкубации, 30 мин инкубации, 0 мин инкубации.

протонам (6') и (5') имидазольного кольца His14 (рис. 1). Падения интенсивности сигналов других а.о. не наблюдалось. Таким образом, можно заключить, что деградация G2 происходит посредством одновременного отщепления остатков Trp2 и His14 с образованием фрагмента TLNSAGYLLGP. Аналогично протекает деградация G3 — с образованием фрагмента TLNSAGYLLGPβA. Деградация G1 предположительно протекает с образованием TLNSAGYLLGP и AIDNHRFSFDKHGLT-NH₂. Из-за отсутствия ключевых а.о. G1 и Trp2, необходимых для связывания с рецепторами галанина [11], продукты деградации TLNSAGYLLGP и TLNSAGYLLGPβA должны проявлять низкую аффинность по отношению к GalR2 и слабую биоактивность. Это обусловлено тем, что N-концевой конец полноразмерного галанина G1 имеет решающее значение для биологической активности пептида, а его C-концевая часть предназначена для стерической защиты N-концевой части пептида от протеолитической деградации [17]; она не связана с рецепторами GalR1-3 и не обладает биологической активностью [18]. Вероятно, это в полной мере может быть отнесено к другому продукту деградации G1 AIDNHRFSFDKHGLT-NH₂, вызванной отщеплением His14.

Для анализа кинетики деградации пептидов G1–G3 были выбраны сигналы от протонов H-7 и H-10 индольного кольца а.о. Trp (рис. 1). Зависимости интегральной интенсивности данных сигналов от времени приведены на рисунке 2. Видно, что практически в течение всей инкубации интенсивность сигналов протонов Trp снижалась в ряду G3 > G2 > G1. Рассчитанные константы скорости реакции отщепления а.о. Trp и времена полужизни пептидов в плазме приведены в таблице 2. Наблюдаемые константы скорости деградации пептида G1 были достоверно выше, чем у N-концевых фрагментов G2 и G3. Различия этого показателя между пептидами G2 и G3 не были статистически значимыми, но находились на уровне статистической тенденции ($p = 0,06$). В соответствии с этими данными наименьшее время полужизни было обнаружено

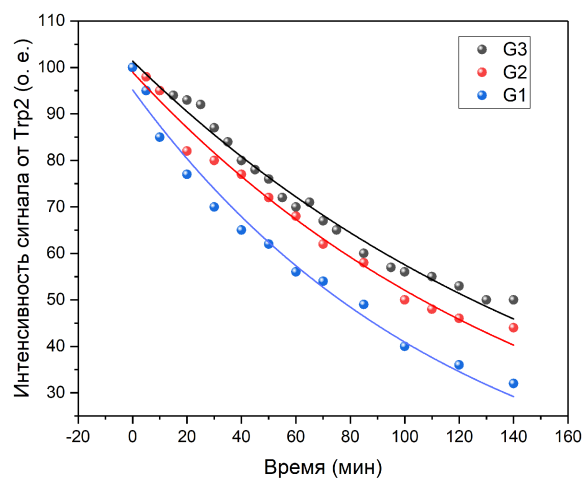


Рисунок 2. Кинетика изменения интегральной интенсивности сигналов протонов а.о. Trp в составе пептидов галанина G1-G3.

КИНЕТИКА ДЕГРАДАЦИИ ПЕПТИДОВ ГАЛАНИНА В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Таблица 2. Наблюдаемые константы скорости деградации пептидов галанина в плазме крови

Пептид	Наблюдаемая константа скорости реакции (k, с ⁻¹)	Время полужизни, мин
G1	(14,1±0,7)×10 ⁻⁵	76
G2	(10,7±0,4)×10 ^{-5*}	106
G3	(9,4±0,3)×10 ^{-5#}	125

Примечание: **p*=0,014 по сравнению с G1; #*p*=0,004 по сравнению с G1.

у полноразмерного галанина G1, у фрагментов G2 и G3 оно было продолжительнее в 1,4 и 1,6 раза соответственно. Следует отметить, что одним из ограничений использованного в настоящей работе подхода к оценке протеолитической стабильности пептидов галанина является относительно низкая чувствительность метода ¹H-ЯМР. Это приводит к необходимости работы в области концентраций галанинов, существенно превышающих фармакологические. Поэтому время полужизни пептида G1 в наших опытах выше значений, полученных в плазме на моделях *in vivo* [9, 10]. Несмотря на это, у нас была возможность сравнить стабильность структуры в ряду пептидных аналогов в одинаковых условиях, независимо от вида лабораторных животных. Главным результатом работы является обнаружение большей протеолитической стабильности химерного агониста рецепторов GalR2 пептида G3 по сравнению с природным фрагментом G2 и полноразмерным галанином G1.

Недавние исследования выявили роль галанина и его природных и модифицированных N-концевых фрагментов в регуляции метаболического и функционального состояния сердца при различных формах сердечно-сосудистого стресса [19–22]. Анализ уровней мРНК рецепторов галанина свидетельствует о том, что GalR2 преобладает в культивируемых миоцитах и сердце [7]. Более того, при определении рецепторов галанина специфическими антителами с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии, было выяснено, что их экспрессия в сердце снижается в следующей последовательности GalR2 > GalR1 > GalR3 [23]. Эти данные предполагают ключевую роль рецепторов GalR2 в действии на миокард. Ранее мы продемонстрировали, что фармакологический агонист G3 оказывает защитное действие при ишемическом/реперфузионном повреждении сердца [19], кардиомиопатии, вызванной доксорубицином [6] и стрептозотоцин-индуцированном диабете [24]. Взятые вместе эти экспериментальные факты указывают на принципиальную роль активации рецепторов GalR2 в реализации эффектов пептидов галанина и предполагают целесообразность молекулярного конструирования фармакологических агонистов с улучшенными физико-химическими характеристиками (протеолитическая стабильность и растворимость). Такие синтетические пептидные биорегуляторы могут быть использованы для разработки препаратов, уменьшающих стресс-индуцированные изменения в организме и сердце.

ВЫВОДЫ

Изучена кинетика деградации GWTLSAGYLLGPHAIIDNHRFSFDKHLGT-NH₂ (G1),

природного N-концевого фрагмента галанина WTLNSAGYLLGPHA-OH (G2) и его модифицированного аналога WTLNSAGYLLGPβAH-OH (G3) в плазме человека методом ¹H-ЯМР спектроскопии. Показано, что время полужизни пептидов галанина увеличивается в следующем ряду G1 < G2 < G3. Мы полагаем, что создание протеолитических стабильных пептидных агонистов рецепторов галанина GalR2 является перспективным подходом к активации галанинергической системы для защиты жизненно важных органов при патофизиологических состояниях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минздрава РФ (НИОКТР 121031700143-1). О. Ю. С. (ИХКГ СО РАН) благодарит Министерство науки и высшего образования РФ за финансовую поддержку в рамках госзадания (FWGF-2021-0003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Процедура забора крови, выполненная добровольцами, соответствовала этическим стандартам национального исследовательского комитета, а также Хельсинкской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней. У добровольцев было получено информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lang R., Gundlach A.L., Holmes F.E., Hobson S.A., Wynick D., Hökfelt T., Köfler B. (2015) Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity. *Pharmacol. Rev.*, **67**(1), 118–175. DOI: 10.1124/pr.112.006536
2. Branchek T.A., Smith K.E., Gerald C., Walker M.W. (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**(3), 109–117. DOI: 10.1016/S01656147(00)01446-2
3. Писаренко О.И., Студнева И.М., Веселова О.М. (2021) Модифицированные N-концевые фрагменты галанина: кардиопротекторные свойства и механизмы действия. *Биохимия*, **86**(10), 1502–1512. DOI: 10.31857/S0320972521100079 [Pisarenko O.I., Studneva I.M., Veselova O.M. (2021) Modified N-terminal fragments of galanin: cardioprotective properties and mechanisms of action. *Biochemistry (Moscow)*, **86**(10), 1502–1512. DOI: 10.1134/S000629792110014X]

4. Serebryakova L., Veselova O., Studneva I., Dobrokhoto I., Palkeeva M., Avdeev D., Molokoedov A., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. (2022) Exogenous GalR2-specific peptide agonist as a tool for treating myocardial ischemia/reperfusion injury. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **37**(6), 1109–1118. DOI: 10.1111/fcp.12925
5. Pisarenko O., Timotin A., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. (2017) Cardioprotective properties of N-terminal galanin fragment (2-15) in experimental ischemia/reperfusion injury. *Oncotarget*, **8**(60), 101659–101671. DOI: 10.18632/oncotarget.21503
6. Studneva I.M., Veselova O.M., Bahtin A.A., Konovalova G.G., Lankin V.Z., Pisarenko O.I. (2020) The mechanisms of cardiac protection using a synthetic agonist of galanin receptors during chronic administration of doxorubicin. *Acta Naturae*, **12**(1), 89–98. DOI: 10.32607/actanaturae.10945
7. Boal F., Cinato M., Timotin A., Münzberg H., Qualls-Creekmore E., Kramar S., Loi H., Roncalli J., Keita S., Tronchere H., Kunduzova O. (2022) Galanin regulates myocardial mitochondrial ROS homeostasis and hypertrophic remodeling through GalR2. *Front. Pharmacol.*, **13**, 869179. DOI: 10.3389/fphar.2022.869179
8. Martinelli I., Timotin A., Moreno-Corchado P., Marsal D., Kramar S., Loy H., Joffre C., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. (2021) Galanin promotes autophagy and alleviates apoptosis in the hypertrophied heart through FoxO1 pathway. *Redox Biol.*, **40**, 101866. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101866
9. Holst J.J., Bersani M., Hvidberg A., Knigge U., Christiansen E., Madsbad S., Harling H., Kofod H. (1993) On the effects of human galanin in man. *Diabetologia*, **36**(7), 653–657. DOI: 10.1007/BF00404076
10. Carey D.G., Iismaa T.P., Ho K.Y., Rajkovic I.A., Kelly J., Kraegen E.W., Ferguson J., Inglis A.S., Shine J., Chisholm D.J. (1993) Potent effects of human galanin in man: growth hormone secretion and vagal blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**(1), 90–93. DOI: 10.1210/jcem.77.1.7686918
11. Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Авдеев Д.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Азьмуко А.А., Серебрякова Л.И., Веселова О.М., Студнева И.М., Писаренко О.И. (2020) Конвергентный синтез галанина крысы и изучение его биологической активности. *Биоорганическая химия*, **46**(1), 32–42. DOI: 10.31857/S0132342320010121 [Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Avdeev D.V., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Azmuko A.A., Serebryakova L.I., Veselova O.M., Studneva I.M., Pisarenko O.I. (2020) Convergent synthesis of the rat galanin and study of its biological activity. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **46**(1), 32–42. DOI: 10.1134/S1068162020010100]
12. Lundström L., Lu X., Langel U., Bartfai T. (2005) Important pharmacophores for binding to galanin receptor 2. *Neuropeptides*, **39**(3), 169–171. DOI: 10.1016/j.npep.2004.12.029
13. Vlieghe P., Lisowski V., Martinez J., Khrestchatisky M. (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov. Today*, **15**(1–2), 40–56. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.10.009
14. Palkeeva M., Studneva I., Molokoedov A., Serebryakova L., Veselova O., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. (2019) Galanin/GalR1-3 system: a promising therapeutic target for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 1556–1562. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.182
15. Khapchaev A.Y., Kazakova O.A., Samsonov M.V., Sidorova M.V., Bushuev V.N., Vilitkevich E.L., Az'muko A.A., Molokoedov A.S., Bespalova Zh.D., Shirinsky V.P. (2016) Design of peptidase-resistant peptide inhibitors of myosin light chain kinase J. *Pept. Sci.*, **22**(11–12), 673–681. DOI: 10.1002/psc.2928
16. Sidorova M., Studneva I., Bushuev V., Pal'keeva M., Molokoedov A., Veselova O., Ovchinnikov M., Pisarenko O. (2020) [MeArg¹, NLe¹⁰]-apelin-12: optimization of solid-phase synthesis and evaluation of biological properties *in vitro* and *in vivo*. *Peptides*, **129**(8), 170320. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170320
17. Saar I., Runesson J., McNamara I., Järv J., Robinson J.K., Langel U. (2011) Novel galanin receptor subtype specific ligands in feeding regulation. *Neurochem. Int.*, **58**(6), 714–720. DOI: 10.1016/j.neuint.2011.02.012
18. Fisone G., Berthold M., Bedecs K., Undén A., Bartfai T., Nilotelli R., Consolo S., Crawley J., Martin B., Nilsson S. (1989) N-Terminal galanin-(1-16) fragment is an agonist at the hippocampal galanin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**(23), 9588–9591. DOI: 10.1073/pnas.86.23.9588
19. Serebryakova L., Studneva I., Timoshin A., Veselova O., Palkeeva M., Ovchinnikov M., Az'muko A., Molokoedov A., Sidorova M., Pisarenko O. (2021) Galanin peptides alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing reactive oxygen species formation. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **27**(4), 2039–2048. DOI: 10.1007/s10989-021-10233-9
20. Studneva I., Palkeeva M., Veselova O., Molokoedov A., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. (2019) Protective effects of a novel agonist of galanin receptors against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cardiovasc. Toxicol.*, **19**(2), 136–146. DOI: 10.1007/s12012-018-9483-x
21. Hinghofer-Szalkay H.G., Rössler A., Evans J.M., Stenger M.B., Moore F.B., Knapp C.F. (2006) Circulatory galanin levels increase severalfold with intense orthostatic challenge in healthy humans. *J. Appl. Physiol.*, **100**(3), 844–849. DOI: 10.1152/japplphysiol.01039.2005
22. Alston E.N., Parrish D.C., Hasan W., Tharp K., Pahlmeyer L., Habecker B.A. (2011) Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms. *Neuropeptides*, **45**(1), 33–42. DOI: 10.1016/j.npep.2010.10.002
23. Šípková J., Šída P., Kaspříková N., Kramáriková I., Hyníe S., Klenerová V. (2017) Effect of stress on the expression of galanin receptors in rat heart. *Folia Biologica (Praha)*, **63**(3), 98–104. DOI: 10.14712/fb2017063030098
24. Студнева И.М., Веселова О.М., Доброхотов И.В., Серебрякова Л.И., Палькеева М.Е., Молокоедов А.С., Азьмуко А.А., Овчинников М.В., Сидорова М.В., Писаренко О.И. (2022) Химерный агонист рецептора галанина GalR2 уменьшает повреждение сердца крыс при стрептозототин-индуцированном диабете. *Биохимия*, **87**(3), 430–441. DOI: 10.31857/S0320972522030095 [Studneva I.M., Veselova O.M., Dobrokhoto I.V., Serebryakova L.I., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S., Azmuko A.A., Ovchinnikov M.V., Sidorova M.V., Pisarenko O.I. (2022) Chimeric agonist of galanin receptor GalR2 reduces heart damage in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry (Moscow)*, **87**(4), 346–355. DOI: 10.1134/S0006297922040046]

Поступила в редакцию: 22. 11. 2024.

После доработки: 28. 01. 2025.

Принята к печати: 30. 01. 2025.

THE STUDY OF BIODEGRADATION OF GALANIN AND
ITS N-TERMINAL FRAGMENTS IN A MODEL SYSTEM *IN VITRO*

D.V. Avdeev^{1}, O.Yu. Selyutina², M.V. Sidorova¹, O.I. Pisarenko¹*

¹Chazov National Medical Research Center for Cardiology,
15a Acad. Chazov str., Moscow, 121552 Russia; *e-mail: mityaavdeev93@mail.ru

²Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion SB RAS,
3 Institutskaya str., Novosibirsk, 630090 Russia

Exogenous N-terminal fragments of galanin, which are agonists of the GalR2 receptor, have therapeutic potential in experimental cardiac pathology. This implies the need to study their proteolytic stability in biological environments. The aim of this work was to evaluate the proteolytic degradation of galanin G1 (GWTLSAGYLLGPH AIDNHR SFSDKHGLT-NH₂), its natural and modified fragments G2 and G3 (WTLNSAGYLLGPHA-OH and WTLNSAGYLLGPβAH-OH, respectively) in human plasma. The peptides were obtained by solid-phase synthesis using the Fmoc methodology, purified by HPLC; their structure was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry and ¹H-NMR spectroscopy. The kinetics of galanins G1–G3 degradation in blood plasma was studied by ¹H-NMR spectroscopy based on changes in the intensity of Trp2 signals at 310 K. The results indicate a higher proteolytic stability of the G3 peptide compared to the natural G2 fragment and full-length galanin G1. They indicate the potential of using modified peptide agonists of GalR2 receptors to protect vital organs in pathophysiological conditions.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: galanin; N-terminal fragments of galanin; ¹H NMR; human plasma

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of the Russian Federation (Research and Development Project 121031700143-1). O. Yu. S. (ICCG SB RAS) is grateful to the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for financial support within the framework of the State Assignment (FWGF-2021-0003).

Received: 22.11.2024; revised: 28.01.2025; accepted: 30.01.2025.